

(22) 遺伝子操作微生物の環境中での生残性 に関する基礎的研究

第一報 嫌気的環境における遺伝子保持能

STUDY ON SURVIVAL POTENTIAL OF GENETICALLY ENGINEERED MICROORGANISMS IN
NATURAL ENVIRONMENT.....1. Possessing capability of gene in anaerobic
environment.

遠藤銀朗*

Ginro ENDO

ABSTRACT; A model experiment was done to investigate the possessing potential of a gene by genetically engineered microorganisms in anaerobic environment. *E. coli* JM103 was transformed with recombinant plasmid pTH125 (pUC8 inserted with kanamycin resistant gene (kan) from plasmid pSY343 at the Bam HI and Hin dIII site), and the transformed *E. coli* was cultivated under aerobic and anaerobic conditions in L-broth without kanamycin. The transformant which was anaerobically transplanted in strictly anaerobic L-broth using Hungate's oxygen-free gas blowing method lost its relative population more rapidly than that of aerobically transplanted *E. coli* transformant. Under strictly anaerobic cultivation, the elimination rate of kan containing *E. coli* JM103 was about 2.5 times higher than the result measured under aerobic cultivation.

KEY WORDS; Genetically engineered microorganisms, survival potential, anaerobic environment, transformant of *E. coli*.

1. はじめに

遺伝子操作微生物の開放環境中での利用について、その技術的な効果と安全性の両面より多くの議論がなされるようになってきている。これは従来の遺伝子工学と工業上の利用が閉鎖された細胞培養系に限定されていたのに対して、最近では農業生産技術や環境制御技術として開放環境中で遺伝子工学の利用範囲の拡大を目指すようになって来たためである。

人工的に組換えられたDNA分子が自然環境中でのどのように挙動するかについては、基礎的な情報が不足しているためにほとんど知られていないのが現状と言える。知られている現象の一つは伝達性ベクターを介しての遺伝子の他微生物への伝播であるが、この場合もいろいろの条件によって変化する複雑な現象であるため、実際に自然界でなされている伝播の機構についてはよく知られていない。

一方、個々の遺伝子あるいは特定配列のDNA分子断片を検出し、それによって細胞の特性や存在状態を

* 東北学院大学工学部土木工学科 Department of Civil Engineering, Tohoku Gakuin University.

把握する方法が開発されてきている。最も一般的に利用されるようになってきているものは、ヒト遺伝子病の胎児期における診断に対してである。また感染症診断にも利用されはじめ、血清学的方法と同様な目的で感染原因微生物の同定に使われるようになってきており、これらは臨床病理上の「DNA診断法」として確立されつつある。

本研究は、環境生態系の変動をそれを構成するいくつかの特定微生物のポプレーションの変動から把握するために、特定微生物の環境中での存在量をその微生物特有のDNAを用いて定量化する手法の確立を最終の目的として開始された。すなわち病理学上のDNA診断を環境生態系のDNA診断にも活用しようとするものである。その初めの研究として、培養条件すなわち生育の環境条件によって非伝達性プラスミド（薬剤耐性遺伝子を有する）を保有する大腸菌（*Escherichia coli* 以下 *E. coli*）の生残性がどのように変化するかについて検討した。培養条件としては *E. coli* に対して一般に用いられる好気培養による継代培養をコントロールとして Hungateによるガス噴射法¹⁾によって作られる絶対嫌気性の条件下で継代培養した場合について調べた。

2. 実験材料および方法

2. 1 プラスミド pSY343 からのカナマイシン耐性遺伝子 (*kan*) の回収

コンピテント化した *E. coli* K12 HB101 (Rec A⁻, r⁻, m⁻, Str^R) をプラスミド pSY343 (9.5Kbp, Kan^R) で形質転換した後、カナマイシン 50 µg/mL を含む L プロス中でこのプラスミドの大量増幅を行なった。クローニングされた pSY343 は常法によって *E. coli* を溶菌後エタノール沈殿によって回収した。この回収プラスミドを制限酵素 *Bam* HI および *Hin* dIII によって切断したのち、サブマリニアガロース電気泳動によって Kan^R をコードする DNA 断片 (約 1.8 Kbp, 以下 *kan*) を分離し、透析チューブで電気泳動する方法²⁾によって回収した。

2. 2 クローニングベクタープラスミド pUC8 への *kan* のスプライシングと組換え DNA による *E. coli* の形質転換

プラスミド pUC8 (約 2.7 Kbp, Amp^R) は lacZ α 領域に *Bam* HI と *Hin* dIII のクローニングサイトを有しかつ両制限酵素によって切り取られる DNA 断片が 16 bp と小さいリラックス型の *E. coli* 用クローニングベクターである³⁾。したがって 2. 1 に示した pSY343 から *Bam* HI および *Hin* dIII で切り取った *kan* を方向性を変える事無く結合しかつトータル bp が 4. 4 Kbp と比較的小さい非伝達性プラスミド組換え分子を作ることができると考えられる。この pUC8 を *Bam* HI と *Hin* dIII によって切断した後、低分子 DNA を除去するために一旦電気泳動にかけたのち *kan* の回収法と同一の方法によって回収し精製した。これと 2. 1 で用意した *kan* とを混合し T₄ DNA リガーゼを用いて結合させ新規クローニング用プラスミドを作成した (以下このプラスミドを pTH125 と呼ぶ)。

pTH125 を用いて *E. coli* HB101 と *E. coli* JM103 の形質転換を行ない、形質転換率およびカナマイシンを含む L プロスでの増殖特性について検討し、実験目的に応じた宿主ベクター系としての特性を調べた。

2. 3 pTH125 によって形質転換した *E. coli* JM103 の好気培養と嫌気培養

カナマイシン (50 µg/mL) を含む培地で保存した *E. coli* JM103 形質転換株の好氣的継代培養と嫌氣的継代培養による *kan* 遺伝子の保持性を調べるに当たっては、(カナマイシンを含まない) L プロスを用意したうえで好気培養ではシリコン栓で封じて振とう培養を行ない、嫌気培養では L プロス + 300 µg/mL 塩酸システイン + 10 µg/mL レサズリンの培地を用いて、還元銅カラムを通した窒素ガスの噴射によって溶存酸素およ

びヘッドスペースの酸素をバージしてブチルゴム栓で密閉した完全嫌気（メタン菌等の絶対嫌気性微生物の培養条件と同程度の嫌気度）の状態に振とう培養を行ない、それぞれの培養液の OD_{650} が0.1になるまで培養した。 OD_{650} が0.1に達した培養は直ちに氷冷した後、次のLプロスに0.1% (V/V) だけ接種して植え継ぐか18% グリセリンを加えて -22°C で保存した後同様に植え継いだ。

3. 実験結果

E. coli HB101と*E. coli* JM103の OD_{650} に対する塗抹平板法でもとめた全生菌数の関係を図-1に示した。この結果を基にして $OD=0.1$ における生菌数（個/mL）を求め、それに対して継代培養したトランスホーマントの同一 OD における生残率を求めた。

パッセンジャードナーとして用いたプラスミドpSY343の制限酵素地図⁴⁾を図-2に示した。未切断pSY343と制限酵素によって切断したpSY343のアガロースゲル電気泳動の写真を図-3に示した。この電気泳動写真より BamHIと HindIIIによって約1.7Kbpの kanDNA断片が切り取られていることが分かる。

図-4に新規クローニングベクターpTH343を作るまでの組換えDNA分子の作成手順を示した。

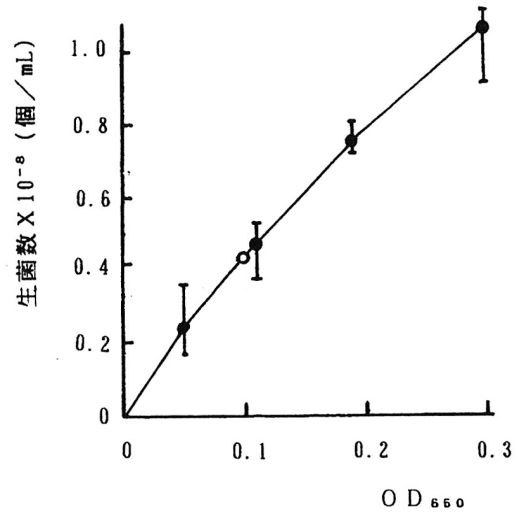


図-1 *E. coli* の OD_{650} と生菌数との関係

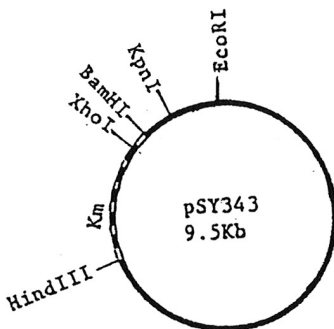


図-2 pSY343の制限酵素地図



図-3 pSY343の電気泳動写真
 レーン1, 5: λ DNA / HindIII
 2: 未消化pSY343
 3: pSY343 / HindIII
 4: pSY343 / HindIII
 および BamHI

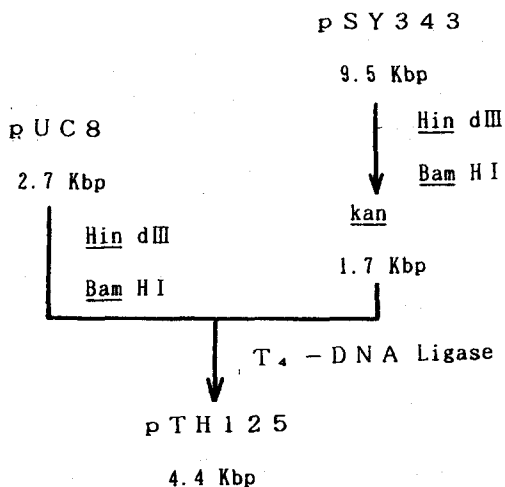


図-4 pTH125の作成の概要

pTH125によって形質転換した *E. coli* HB101 と JM103のカナマイシンを含むLプロスでの増殖 (好気、振とう、37℃) 特性を図-5に示した。

pTH125によって形質転換した *E. coli* JM103 をカナマイシンを含まないLプロス中でOD₆₅₀が0.1になるまで好氣的に培養した後カナマイシンを含むL寒天上で計算した結果を、全生菌数に対するKan^r形質保有菌数 (*kan* 遺伝子保有菌数) の割合 (%) の継代培養回数による変化を図-6に示した。同様にpTH125によって形質転換した *E. coli* JM103を絶対嫌気性の条件下で同様に (OD₆₅₀ = 0.1 で植え継ぐ) 継代培養した場合の全生菌数に対するKan^r形質保有菌数の割合の変化を図-7に示した。

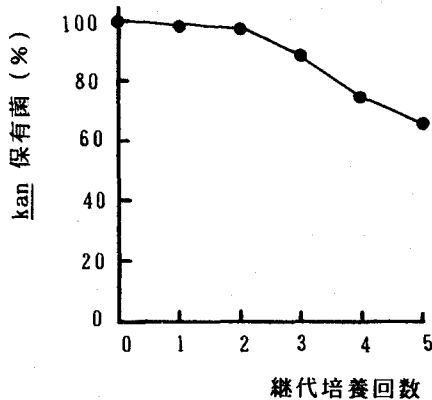


図-6 好氣的培養での遺伝子保持性

表-1 pTH125による *E. coli* HB101と JM103の形質転換率

Strain	形質転換率 (Transformant個/μgDNA)
<i>E. coli</i> HB101	9.8×10^5
<i>E. coli</i> JM103	1.6×10^6

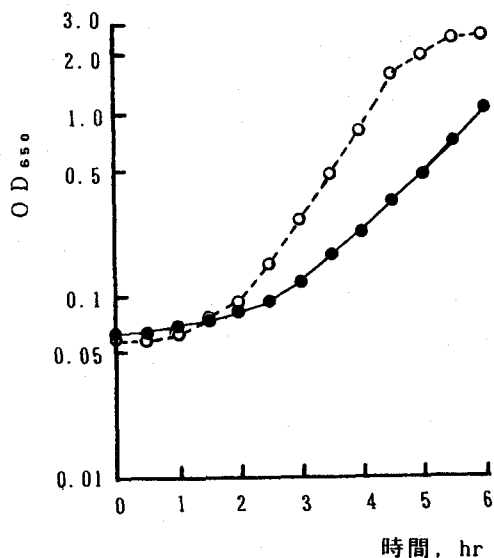


図-5 pTH125形質転換 *E. coli* の増殖特性: (●) *E. coli* HB101 (○) *E. coli* JM103

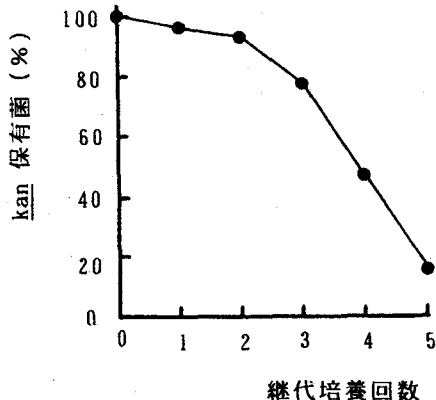


図-7 嫌気培養での遺伝子保持性

4. 考 察

プラスミド pSY343 由来の kan を広宿主域クローニングベクタープラスミド pUC8 に繋いで作られた新規クローニングベクター pTH125 を用いて kan 遺伝子による *E. coli* の形質転換を行なった。pTH125 に対する宿主としての適性は、表-1 に示した形質転換率および組換え体の増殖速度のいずれにおいても *E. coli* HB101 よりも JM103 が勝っており、遺伝子保持能の検討を行なうに当たっては *E. coli* JM103 の組換え体を用いることとした。JM103 株が宿主として勝っていたのはこの株がメチル化などのメチル化を受けなかったこと、Rec A⁺ であるために kan のプラスミド分子内増幅が生じたことなどが考えられる。

図-6 および図-7 は、*E. coli* JM103 が好氣的に増殖する場合と嫌氣的に増殖する場合とで培養の継代回数によって組換え遺伝子の保持性（発現性）がどのように異なるかを示している。好氣的継代培養では継代回数に対してプラスミドとして組み込んだ核外遺伝子の脱落は少なく、組換え遺伝子はその発現の必要の有無にかかわらず比較的長期に亘って保持された。これに対して嫌氣的な継代培養では、生育条件として組み込んだ遺伝子の発現が必要とされない場合においては、好氣的培養に比較してより速やかにその発現性を失った。この過程での kan 遺伝子の消失をコロニーハイブリダイゼーション法によって調べたところ、kan 遺伝子保有コロニーの割合は図-7 に示した全菌数に対するカナマイシン耐性菌数の割合と同程度に減少していたことから、カナマイシン非存在下での絶対嫌氣的な培養においては kan 遺伝子の脱落が高頻度で生じたものと考えられる。

以上の結果は、*E. coli* JM103 が好氣的な生育と嫌氣的な生育とで組み込み遺伝子の保持性（すなわち組換え体の生残性）を変化させることを示しており、遺伝子操作微生物の環境中での生残性は単に遺伝子操作微生物の特性のみならず生育環境条件との相互作用において把握する必要があることを示している。しかし、このような相互作用は微生物の種類や微生物の生育の特性によっても異なるものと考えられる。また生育環境と組換え体との相互作用がどのようなメカニズムによって生じてくるかについては、さらに基礎的な研究が必要と考えられる。

5 おわりに

本研究においては、組換え DNA 微生物の生育条件の違いによる組換え DNA 分子の遺伝的保持能力の変化を、*E. coli* JM103 を用いたモデル実験より検討した。得られた結果は好氣的に培養された場合と嫌氣的に培養された場合とではプラスミドとして組み込まれた遺伝子の保持性が異なることを示した。

自然界の嫌氣的な環境における組換え DNA 微生物の挙動は殆ど知られていないのが現状であり、ここでの実験用大腸菌と既存ベクターを用いたモデル実験だけから微生物の嫌氣的生育の場における遺伝子の挙動を予測できるものではない。しかしこのような基礎データの積み上げがなければ、組換え体を環境中で利用するための安全性と効果についての評価は不可能と考えられる。

一方遺伝子の消失の確認のためにここで用いたコロニーハイブリダイゼーションは、環境中の特定の微生物の存在量をその微生物特有の DNA 分子をプローブとして *in situ* で調べる手法を提供しうる。したがって環境生態系の構成・変動およびそれと環境変化との相互作用を調べるための有効な研究手法となりうると思われる。しかし煩雑な実験操作を伴うため、より簡便で環境調査に応用できる手法に改良する余地が残されている。即ち「環境生態系の DNA 診断」にはそれに必要とされる新しい研究手法の開発が必要とされている。

謝辞 本研究を行なうに当たり、実験材料を提供下さり実験を進めるうえで貴重なご助言を賜りました

東北大学農学部 伊崎和夫先生、神尾好是先生および実験の一部を分担してくれた卒研生（当時）平泉輝幸君に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Bryant, M.P.: Cometary on the Hungate Technique for the Culture of Anaerobic Bacteria, American Journal of Clinical Nutrition, Vol.25, pp1324-1328, 1972.
- 2) 日本細菌学会教育委員会編： 細菌学技術叢書4, Rプラスミドの分子遺伝学的実験法, 菜根出版
昭和58年
- 3) Pouwels, P.H., et al.: Cloning Vectors, Elsevier, 1987.
- 4) 神尾好是： 私信